

Jimena Gallardo
Diego Zappacosta
José Carballo
Juan Manuel Rodrigo
Cristian Gallo
Juan Pablo Selva
Viviana Echenique

La ingeniera agrónoma Gallardo (becaria doctoral CONICET) y los doctores Zappacosta (investigador CONICET), Rodrigo (profesional adjunto CONICET), Gallo (profesional adjunto CONICET), Selva (investigador CONICET) y Echenique (investigadora CONICET) son docentes del Departamento de Agronomía-UNS. El ingeniero agrónomo Carballo es becario doctoral de CONICET.
Contacto: jimena.gallardo@uns.edu.ar

Construcción del mapa genético de Pasto Llorón

Esto abre un abanico de posibilidades para el mejoramiento de esta especie tan utilizada en nuestra zona y también para la mejora genética vegetal en general.

Nuestro grupo realizó la construcción del primer mapa genético de la gramínea *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, vulgarmente llamada pasto llorón, con la localización de la región condicionante de la apomixis.

La apomixis es un modo de reproducción asexual y clonal a través de semillas. La palabra deriva del griego “apo” cuyo significado es falta o ausencia y “mixis” que significa unión o mezcla, haciendo referencia a la falta de unión o falta de mezcla de gametas sexuales. Así, las semillas se forman evitando los procesos de meiosis y fertilización, a partir de tejidos maternos del óvulo. Se cree, que esta capacidad sería desencadenada debido a una desregulación temporal y/o espacial de la vía de desarrollo que conduce a la formación sexual de semillas.

Numerosas familias de plantas poseen la habilidad de reproducirse por apomixis, sin embargo, solo unas pocas son de importancia económica. Las semillas apomícticas contienen embriones genéticamente idénticos a la planta madre, por lo que la introgresión de este carácter en especies de interés agronómico facilitaría la fijación y propagación de la heterosis o vigor híbrido [1] a través de generaciones sucesivas, reduciendo el costo asociado a la producción de nuevos híbridos y permitiendo la propagación por semilla en cultivos altamente heterocigotas [2] que se propagan vegetativamente.

Desde hace más de 10 años, nuestro grupo estudia la apomixis, utilizando como modelo el pasto llorón. Esta gramínea de origen sudafricano, posee una extraordinaria rusticidad y es utilizada como forrajera y para la





conservación de suelos erosionables. Las plantas de llorón, se pueden reproducir por apomixis obligada o facultativa o de manera sexual.

Un mapa genético, es una representación gráfica del orden de pequeños fragmentos de ADN (marcadores moleculares), que identifican las diferencias (polimorfismos) en la secuencia de ADN entre individuos de una población. Muchos tipos de marcadores son utilizados en mapeo genético (por ejemplo, polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, más conocidos por su acrónimo inglés AFLP, amplified fragment length polymorphism; microsatélites o SSR, simple sequence repeat), pero los marcadores tipo SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) son actualmente los más utilizados debido a su abundancia en el ADN. En los últimos años se ha desarrollado una tecnología de genotipado [3] por secuenciación, más conocido por su acrónimo inglés GBS ("Genotyping by Sequencing"), que ofrece la posibilidad de detectar miles de marcadores GBS-SNP en muchos individuos de forma simultánea, con un protocolo rápido, eficiente y de bajo costo por muestra.

Para este mapa, utilizamos una combinación de marcadores tradicionales (AFLP y SSR) y GBS-SNP y logramos localizar la región (*locus* [4]) que controla la apomixis (APO-*locus*).

Primeramente, se generó una población de mapeo compuesta por 62 individuos tetraploides (40


cromosomas), derivados del cruzamiento entre una madre sexual (OTA-S) y un padre apomítico facultativo (Don Walter). Las plantas fueron cultivadas en macetas de 5 litros en invernadero, con un fotoperíodo de 15 h luz.

A fin de evaluar su modo de reproducción se observaron al microscopio unas 30 flores de cada uno de los descendientes. Se encontró una proporción de hijos apomíticos versus sexuales de 1:1 (34:27, con $X^2 = 0.37$), lo que revela que se trata de un modelo de herencia simple y que el carácter es dominante [5].

Luego se extrajo ADN a partir de hojas de todos los individuos de la población, incluidos los parentales y se analizaron con marcadores de tipo SSR y AFLP. Este ADN también fue enviado al Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin (EE.UU.), donde las muestras fueron secuenciadas.

A partir de las secuencias, utilizando técnicas de bioinformática y distintos softwares, se obtuvieron los marcadores GBS-SNP. Luego se seleccionaron los marcadores, en función de su segregación en la población de mapeo y la cantidad de datos faltantes y, aquellos datos que presentaron mejor calidad fueron utilizados para la generación del mapa de ligamiento, con el software Joinmap.

El mapa genético de OTA-S (parental femenino) fue definido por 1.114 marcadores distribuidos en 40 grupos de ligamiento [6], con un mínimo de 2 y un



máximo de 102 marcadores en cada uno (Figura 1). La longitud total del mapa fue de 1.335 cM (cM: centimorgan, unidad de medida de los mapas genéticos), con una densidad media de 1,22 cM por marcador. El mapa del parental masculino (Don Walter), fue construido con 2.019 marcadores distribuidos en 40 grupos de ligamiento, con 7 a 123 marcadores en cada uno (Figura 2). La longitud total del mapa de Don Walter fue de 1.976,2 cM, con un promedio de 0,98 cM por marcador.

La región de la apomixis (*APO-locus*) en el mapa de Don Walter se ubicó en el tercer grupo de ligamiento, junto con otros 65 marcadores (Figura 3). En este *locus* se encuentran cuatro marcadores GBS-SNP con una frecuencia de recombinación de cero, es decir que están ligados [7], lo cual concuerda con estudios anteriores en otras gramíneas, que indican que es una región con baja frecuencia de recombinación.

Conclusiones:

Mediante la construcción del primer mapa genético de *E. curvula* se logró posicionar la región cromosómica que controla la apomixis. En base a las observaciones microscópicas y al análisis con marcadores moleculares, se determinó que un solo *locus* controla la apomixis en el pasto llorón y que este carácter es dominante sobre la sexualidad.

El mapa genético está compuesto por 40 grupos de ligamiento, correspondientes al número de cromosomas de cada parental siendo hasta el momento, el mapa genético más saturado para el género *Eragrostis* y uno de los más saturados para especies forrajeras poliploides [8] y especies apomícticas.

Perspectivas:

La apomixis de tipo *Eragrostis* tiene características particulares que la convierten en un modelo interesante para la transferencia de este carácter:

- A los principales cultivos de cereales y leguminosas y todos aquellos cultivos donde los híbridos son particularmente valiosos pero difíciles de elaborar.
- Para desarrollar rápidamente nuevas variedades híbridas y para mantener el vigor híbrido a través de generaciones sucesivas.
- Para aquellas especies con limitaciones en los mecanismos de reproducción, tales como dificultades en la fertilización o en la polinización, causadas por variedades incompatibles, inadecuada

actividad de polinizadores o por estrés biótico o abiótico.

- Para poder propagar por semilla cultivos altamente heterocigotos, como el caso de la papa o la caña de azúcar.
- A cultivos como el maíz, que son muy sensibles a cambios en la relación de ploidía entre embrión: endosperma, que debe ser igual a 2:3 y en llorón, esta relación es la misma tanto en la semilla sexual como en la apomítica.

Glosario

- 1) Heterosis o vigor híbrido: mayor vigor y productividad obtenidos en las plantas resultantes del cruzamiento de dos padres genéticamente diferentes. Es decir, que las semillas híbridas generan plantas más uniformes, fértiles y de mayor rendimiento en comparación a sus parentales. Las plantas híbridas comerciales, no heredan sus cualidades en con-

junto a su descendencia y en consecuencia, los agricultores tienen que comprar nuevas semillas híbridas año tras año.

- 2) Planta heterocigota: es aquella que posee dos formas distintas de un mismo gen, una forma heredada de la madre y la otra heredada del padre.
- 3) Genotipado: análisis de los polimorfismos que existen en el ADN de los individuos.
- 4) *Locus*: posición fija en un cromosoma, determina la posición de un gen o de un marcador.
- 5) Carácter dominante: característica genética que se manifiesta externamente, en este caso la apomixis.
- 6) Grupo de ligamiento: grupo de marcadores que no segregan en forma independiente durante la meiosis, es decir que se ubican en el mismo cromosoma.
- 7) Marcadores ligados: marcadores que se posicionan muy cerca dentro del mismo grupo de ligamiento, lo que repercute en una baja frecuencia de recombinación durante la meiosis y, por lo tanto, a una mayor probabilidad de herencia conjunta.
- 8) Poliploide: organismos con tres o más juegos completos de cromosomas.

Bibliografía

Carman, J. G. (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61, 51-94. doi: 10.1111/j.1095-8312.1997.tb01778.x

Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S. & Mitchell, S. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLOS ONE* 6(5), e19379. doi: 10.1371/journal.pone.0019379

Meier, M., Zappacosta, D., Selva, J. P., Pessino, S. & Echenique, V. (2011). Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Australian Journal of Botany*, 59, 253-261. doi: 10.1071/BT10267

Zappacosta, D., Gallardo, J., Carballo, J., Meier, M., Rodrigo, J. M., Gallo, C. A., Selva, J. P., Stein, J., Ortiz J. P., Albertini, E. & Echenique V. (2019). A high-density linkage map of the forage grass *Eragrostis curvula* and localization of the diplospory *locus*. *Frontiers in Plant Science* 10:918. doi.org/10.3389/fpls.2019.00918